

Microfold Cell 単離の試み

小塚 一史

ヒトパイエル板リンパ濾胞上皮細胞間に存在する microfold cell (M細胞) は Owen らによって報告されて以来検討が加えられ、免疫組織学的に消化管局所免疫の第一線を担う細胞であることが明らかにされつつある。しかし、なぜ M細胞が抗原物質を捕捉するかについてはいまだ明らかにされていない。このため従来の胞細分離 (トリプシン-EDTA) 法に改良を加え、フローサイトメトリーを応用した方法で家兔回腸パイエル板から M細胞単離を試みた。単離した細胞形態は電顕学的に観察し、機能検討には BCG 菌捕捉の有無を観察し下記の結果を得た。

1) 形態学的によく維持された M細胞を単離回収することができた。2) 単離した M細胞は BCG 菌体を microfold を伸ばして捕捉していた。

この細胞単離法は M細胞単離に有効であり、今後の M細胞機能解明に寄与できるものと考えられた。

(平成元年3月6日採用)

Electron Microscopic Study of Isolated Microfold Cells (M Cells) from Follicle Associated Epithelium (FAE) of Rabbit Peyer's Patch

Kazushi Kozuka

Owen first reported the discovery of microfold cells (M cells) found on follicle associated epithelium (FAE) of the gut. The role of the M cell in the first defense line of the local immune system has been made clear by the immunohistochemical method. However, it is still not clear why microorganisms are attracted to the apical surface of the M cells.

In order to elucidate this mechanism, the author attempted to separate the FAE from rabbit Peyer's patch by an improved version of the trypsin-EDTA method and subsequently used flowcytometry to isolate M cells, preliminarily.

The ultrastructure of isolated M cells was examined electron microscopically. The interaction of isolated cells with BCG was investigated for functional changes.

The results 1) M cells were successfully collected from the FAE with a high degree of viability and their characteristic morphological structure was maintained. 2) The separated M cells were seen to form pseudopod-like extensions to BCG, and phagocytosed BCG in vesicles of the cytoplasm.

川崎医科大学 内科消化器部門Ⅱ
(指導: 木原 彊 教授)
〒701-01 倉敷市松島 577

Division of Gastroenterology, Department of
Medicine (Director: Prof. Tsuyoshi Kihara),
Kawasaki Medical School: 577 Matsushima,
Kurashiki, Okayama, 701-01 Japan

This modified collection method should be useful for study of the functional morphology of M cells. (Accepted on March 6, 1989) *Kawasaki Igakkaishi* 15(2): 277-286, 1989

Key Words ① Microfold cell (M cell) ② Cell isolation ③ Flowcytometry

緒 言

ヒトパイエル板 lymph dome epithelium 間に存在する microfold cell, membranous epithelial cell (以下 M cell) は, 1974年 Owen らによって報告されて以来¹⁾ 電顕学的検討が加えられ口蓋扁桃,²⁾ 孤立リンパ濾胞,³⁾ 虫垂のリンパ濾胞被蓋上皮 follicle associated epithelium (以下 FAE) にも存在し, 形態学的には疎で短い微絨毛を有し cytoplasm によく発達した microvesicular system を持ちリンパ球, マクロファージを内包した特異な細胞であることが明らかとなっている。⁴⁾ 生理機能的には今日までに horseradish peroxidase⁵⁾ をはじめ reovirus,^{6), 7)} vibrio cholerae,⁸⁾ BCG (Bacillus Calmette-Guerin),⁹⁾ 溶連菌および溶連菌製剤¹⁰⁾ など外来抗原の選択的取り込みが報告されており, さらに免疫組織学的には M cell の細胞表面は HLA-DR 陽性, IL-1 陽性であることが証明され¹¹⁾ gut associated lymphoid tissue (以下 GALT) と総称される局所免疫防御機構の first defence line としての役割が解明されつつある。

著者は M cell の抗原の取り込み機構を研究する目的で, まず M cell を単離し in vitro での検討を試みた。FAE 分離の試みは, 島居らの報告があるが¹²⁾ 形態学的な研究を目的とした方法で, 分離した FAE 細胞群から M cell を単離回収することに成功していない。著者は分離した大腸粘膜が高い viability を示す, 諏訪, 吉田らの trypsin-EDTA 法¹³⁾ をもとに新しい方法で家兔回腸パイエル板リンパ濾胞から FAE を剥離し flowcytometry を応用して M cell 単離を行い, 回収した細胞の機能評価として回収細胞浮遊液に BCG 菌の懸濁液を加え菌体捕捉の有無を検討した。

研究材料並びに方法

M cell の単離には FAE に高率に M cell を含む家兔回腸パイエル板を使用した。¹⁴⁾ 体重 2.0~3.0 kg New Zealand White 系 (以下 NZW) 家兔から pentobarbital 麻酔下に開腹し回腸パイエル板を摘出し, 一部は FAE 表面形態の観察を目的として 2.5% glutaraldehyde (以下 GA) + 2% paraformaldehyde (以下 PFA) で固定し ferrocyanide-OsO₄ で後固定した。^{15), 16)} 残りは 100 u/ml PC-G 添加 4°C Hankus balanced salt solution (以下 HBSS) にて十分洗浄し, 一部は一般電顕用に 2.5% GA にて固定した。洗浄後の数個のパイエル板から実体顕微鏡下 (Nikon SMZ-10) に 22G 注射針を用いて 100 個前後の濾胞ドームを摘出した。0.15% trypsin (GIBCO), 0.01% EDTA, 100 u/ml PC-G 添加 HBSS (Nissui) に摘出した濾胞ドームを加え, 100% 酸素を充

```

Surgical removal of ilial Peyer's patches
in NZW-rabbit wt 2.0-3.0 kg
↓
Flushing with HBSS (100u/ml, 4°C, pH 7.2)
↓
Collection of lymphoid follicles by injection
needle (G 22)
↓
Vibration for 15 min. in 4°C, pH 7.2 HBSS
(0.15% trypsin, 0.01% EDTA added)
↓
Filtration through 100μm mesh
↓
Centrifugation at 1000rpm×5 min
↓
Resuspension with 4°C, pH 7.2 HBSS (10%
fetal bovine serum added)
↓
Recentrifugation at 800 rpm×5 min
↓
Filtration repeat through 50μm mesh
↓
Flowcytometry
↓
SEM TEM

```

Fig. 1. Methods for isolating M cells from FAE cells

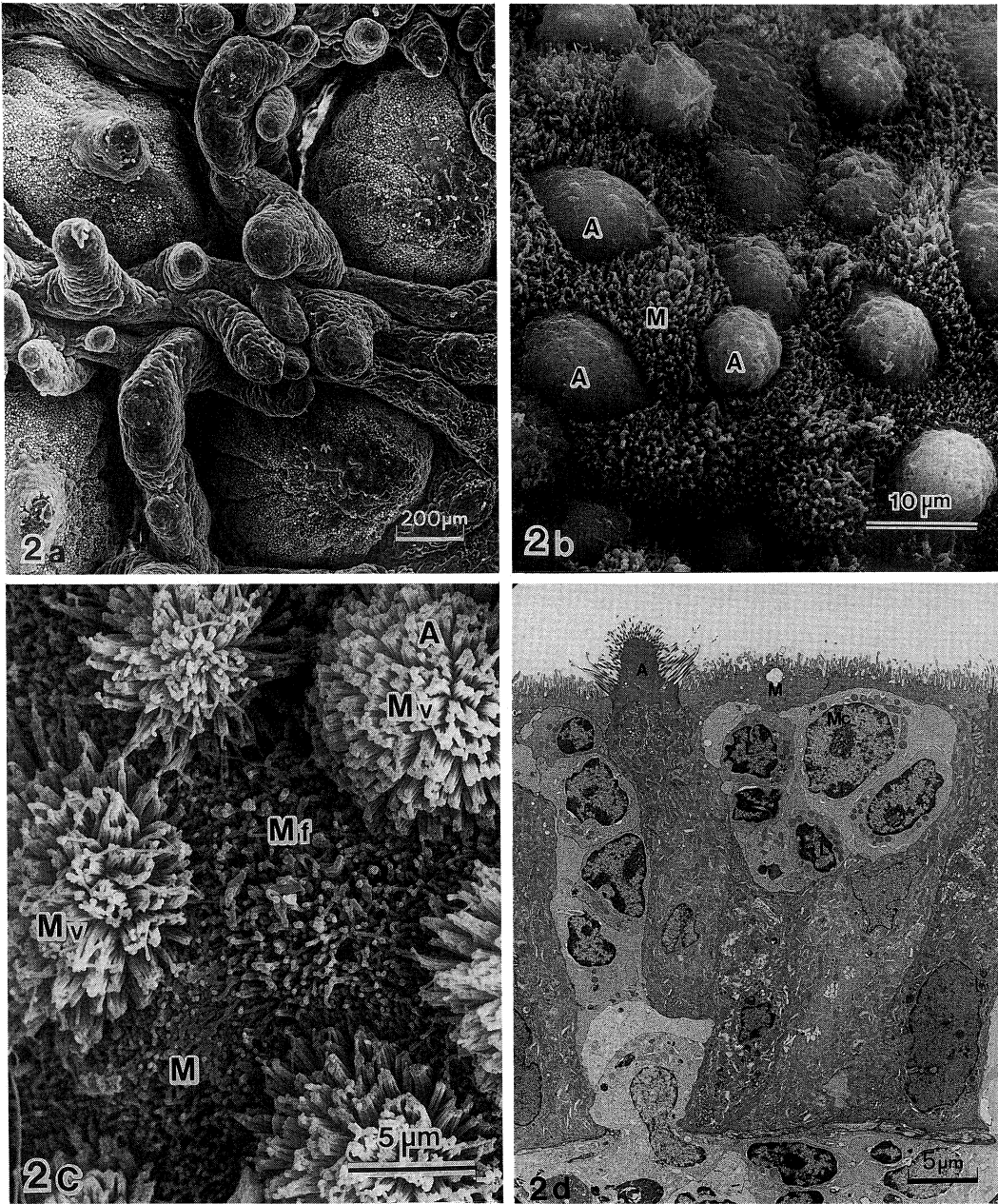


Fig. 2 a. A low magnification scanning electron micrograph (SEM) showing normal lymphoid follicles bulging out from between finger-shaped intestinal villi in the rabbit Peyer's patch ($\times 60$).

b. A high magnification SEM of the luminal surface of the lymphoid follicle. The M cell shows irregular microvilli. Otherwise, the absorptive cell has a thick surface coat (glycocalyx), so microvilli are not visible ($\times 2000$).

c. After flushing with HBSS. Regular microvilli of the surrounding absorptive cell were also observed ($\times 4000$).

d. A low magnification transmission electron micrograph (TEM) of follicle associated epithelium (FAE) in the rabbit Peyer's patch. An M cell enfolds lymphocytes in its intracellular space ($\times 2000$).

M; M cell, A; absorptive cell, Mf; microfold, Mv; microvilli, L; lymphocyte

填した容器で室温にて緩やかに10~15分攪拌したのち100 μm meshにて濾過した。さらに遠沈(1000×5分)したのち, fetal bovine serumを10%濃度まで添加したHBSSを用いて低速遠沈にて洗浄操作を繰り返し再度50 μm meshにて濾過して細胞浮遊液($2 \times 10^7/\text{ml}$)を作製した(**Fig. 1**).

M cellの回収にはflowcytometry(Bectone Dickinson社製FACStar)を用い sampling, nozzle chipは各々70 μm を使用した。データ処理はconsort 30(Hewlett Packard社製)にて行った。forward scattering count(以下FSC), side scattering count(以下SSC)にてdot plot表示された細胞のうちFSC, SSCともに大きい細胞群に対して回収gateを設定し約8~10%の細胞を回収した。回収した細胞のviabilityは0.1% tripan blue stainにて検討した。形態学的にはTsutsuiらの方法¹⁷⁾でガラス板上に作製したpolycation layerに回収した細胞を直接付着させ1.0% GAにて1hr固定, 1.0% osmium後固定を行ったのちethanol

系にて脱水処理し, 臨界点乾燥後, 金・palladium合金を蒸着して走査電顕標本としHitachi S-570にて観察した。一方透過電顕標本は, 回収した細胞を再度低速遠沈したのち1.0% GAを積層して固定, 後固定, 脱水処理後Epon樹脂に包埋, microtome (MT-2B)にて薄切し, 酢酸ウラニール・クエン酸鉛重染色を施したのちHitachi H-500にて観察した。

一方, 回収細胞の機能評価に用いたBCG菌は, 小川培地(Nissui)に経代培養したものをHBSSにて洗浄, 回収し3mm ガラスビーズを用いて懸濁液とし菌体数($8 \sim 21 \times 10^{10}/\text{ml}$)に調整して使用した。回収した細胞浮遊液($1 \times 10^5/\text{ml}$) 2 mlにBCG菌懸濁液3 mlを加え, 混合液中に40%酸素をゆっくり通気し10°Cにて1hr反応させたのち同様に透過, 走査電子顕微鏡にて観察した。

結 果

摘出し GA+PFA 固定 ferrocyanide- OsO_4 処理した NZW 系家兔回腸パイエル板とその表

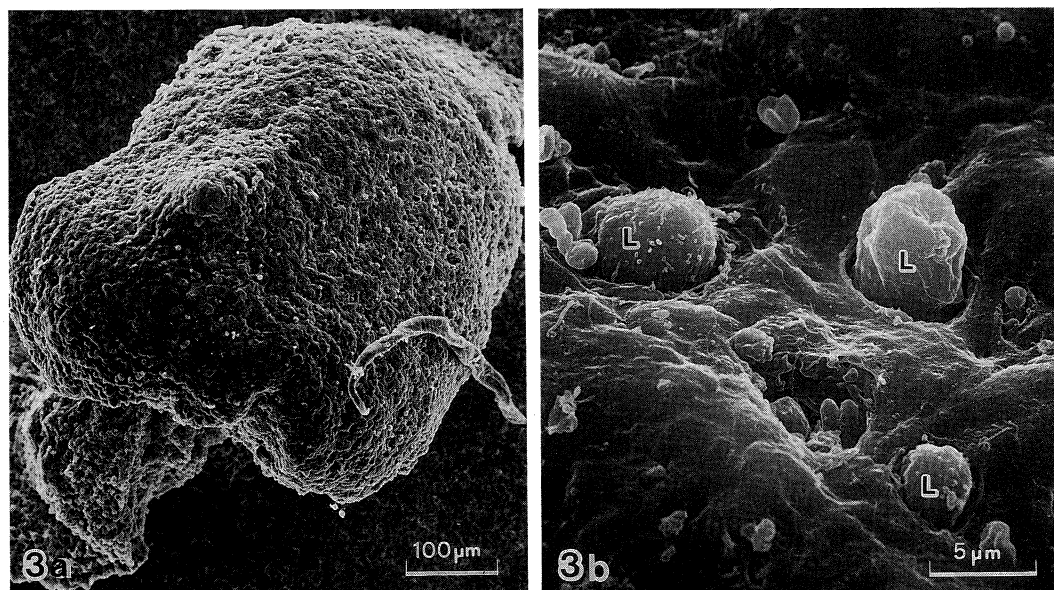
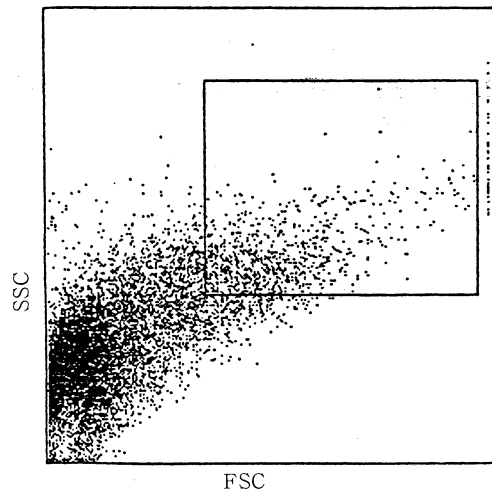


Fig. 3 a. When the lymphoid follicle vibrated for 15 min. in 0.15% trypsin and 0.01% EDTA, FAE cells were removed. Many holes were observed on the naked surface of the dome ($\times 170$).

b. After removal of FAE cells, lymphocytes were seen in the holes ($\times 3500$).
L; lymphocyte

面拡大像では, FAE 表面は厚い糖衣に覆われた上皮細胞と, 疎で短い微絨毛をもつ M cell が確認される. 洗浄操作後では小腸吸収上皮に類似する微絨毛に富んだ上皮細胞と M cell の絨毛形態の差が明瞭となる (Fig. 2a~d). 酵素処理後の濾胞ドームでは, 基底膜並びにその小孔と小孔から遊走するリンパ球が確認でき (Fig. 3a, b), FAE 一層がきれいに剝離されていることがわかる.

flowcytometry にかけた細胞浮遊液の FSC, SSC による dot plot 表示では FSC, SSC ともに小さい細胞群を主体に連続的に大きい細胞群が



Sample: SAMPLE M CELL 001 Date: 18-Sep-87 14:25
Cytometer: FACSTAR File: MCELL 5001
Comments: 0.15% TRYPSIN 0.01% EDTA ROOM TEMP.
AGITATE 15 MIN. ILEUM ONLY

Contour statistics

Parameters: FSC SSC		Gated events: 918		Total events: 10000				
#	X & Y	X & Y	Events	% Gated	% Tot	X & Y	X & Y	Peak
	Lower	Upper				Mean	Mode	
1	0	63	918	100.00	9.18	31.69	23.00	12
	0	63				28.68	29.00	

Fig. 4. Large cells (FSC and SSC) were sorted by the setting gate of the flowcytometry.

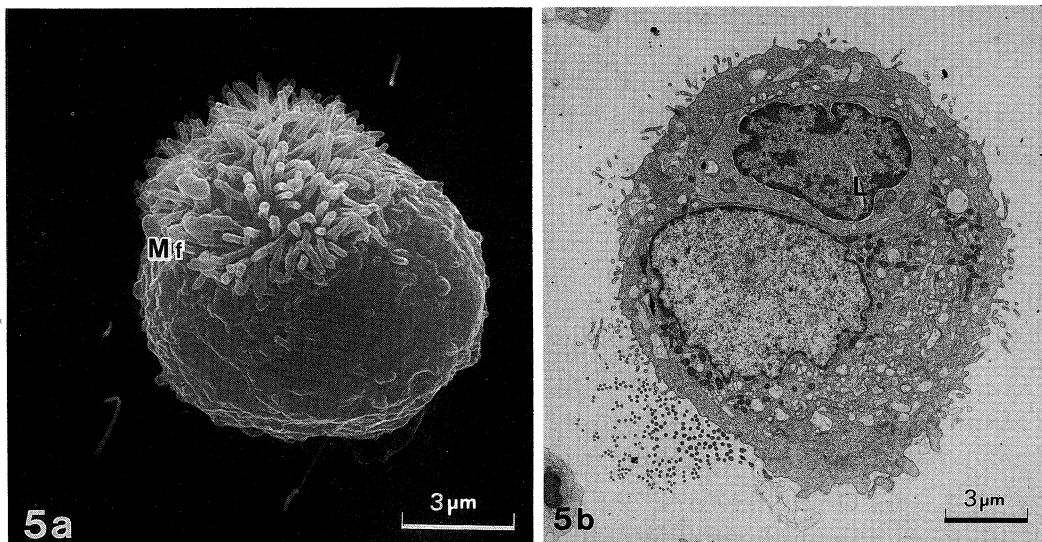


Fig. 5 a. A sorted M cell exhibiting irregular microvilli or irregular ridges on the apical surface ($\times 6000$).

b. A typical M cell enfolds a lymphocyte in the apical cytoplasm. Many vesicles were seen in the whole cytoplasm of the M cell ($\times 3500$).
Mf; microfold, L; lymphocyte

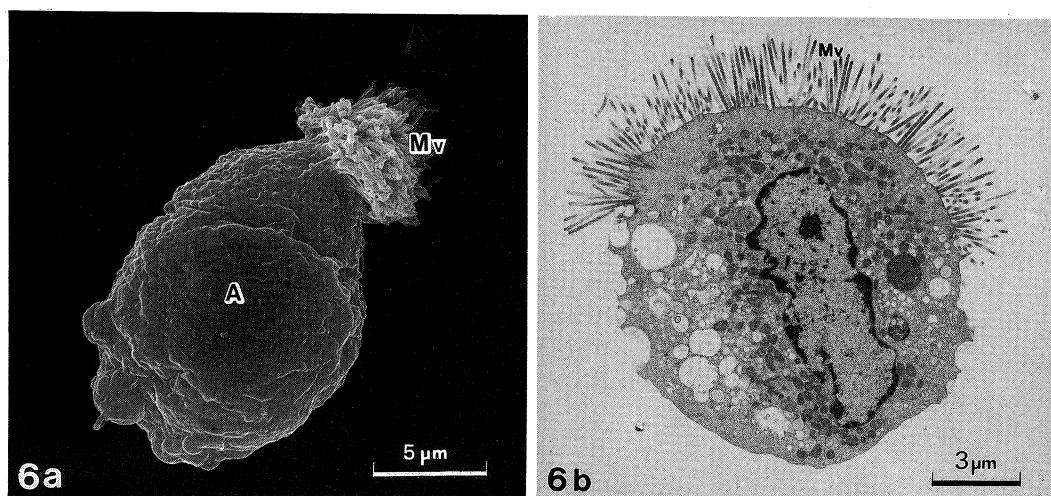


Fig. 6a. This sorted cell, which exhibits a columnar shape with relatively packed microvilli, is an absorptive cell ($\times 4000$).
b. This absorptive cell has straight, closely packed microvilli ($\times 3500$).
 Mv; microvilli, A; absorptive cell

認められた。設定 gate 以外の主体となった細胞群は電顕像にてリンパ球と確認された。

Figure 4 に consort 30 における dot plot 表示と gate 設定をしめす。5 回にわたって行った一連の単離回収操作後の細胞の viability は、いずれも 90 % 以上と良好であった。設定 gate から回収された細胞の走査電顕像では (**Fig. 5a**), 疎で短い irregular microvilli または irregular ridge の形態をよく維持しており吸収上皮 (**Fig. 6a, b**) とは明らかに異なっていた。一方細胞壁底部では島居らの報告のごとくリンパ球が M cell 内に入り込むための管腔口 (hallow) を認めた¹²⁾ (**Fig. 7**)。これらの形態から単離された細胞群は M cell と推定された。さらに透過電顕像ではリンパ球を内包しており M cell と確認することができた (**Fig. 5b**)。M cell は球状化し irregular microvilli は縮小かつ減少し、一部分は microfold の形態を示していた。cytoplasm には空胞化がみられるが mitochondria の形態は維持されていた。回収された細胞の形態から 2000 count 中約 60 % が M cell と考えられた。残り約 40 % は, isolate されていない吸収上皮, リンパ球, マクロファージ, 赤血球塊な

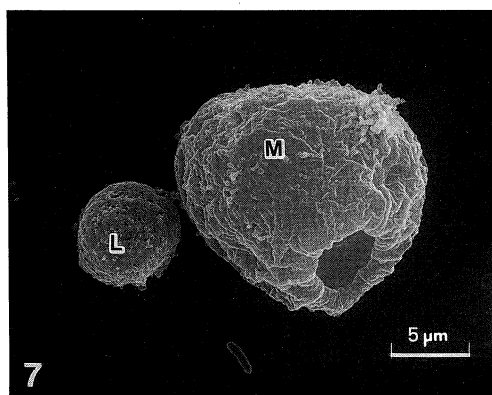


Fig. 7. An isolated M cell with a hole on the undersurface was observed ($\times 3000$).
 M; M cell L; lymphocyte

どであった。

機能検討に用いた BCG 菌体の電顕像を観察すると BCG に特徴的な electron-dense 小顆粒を認めた (**Fig. 8a, b**)。形態学的に比較的よく維持された M cell は走査電顕像では触手様に伸ばした microfold で菌体を包み込むように捕捉しており、透過電顕像でこれを検討すると、あらかじめ BCG ペレットで観察した菌体像と一致し、投与された BCG 菌体を捕捉していることが確認された (**Fig. 9a, b**)。

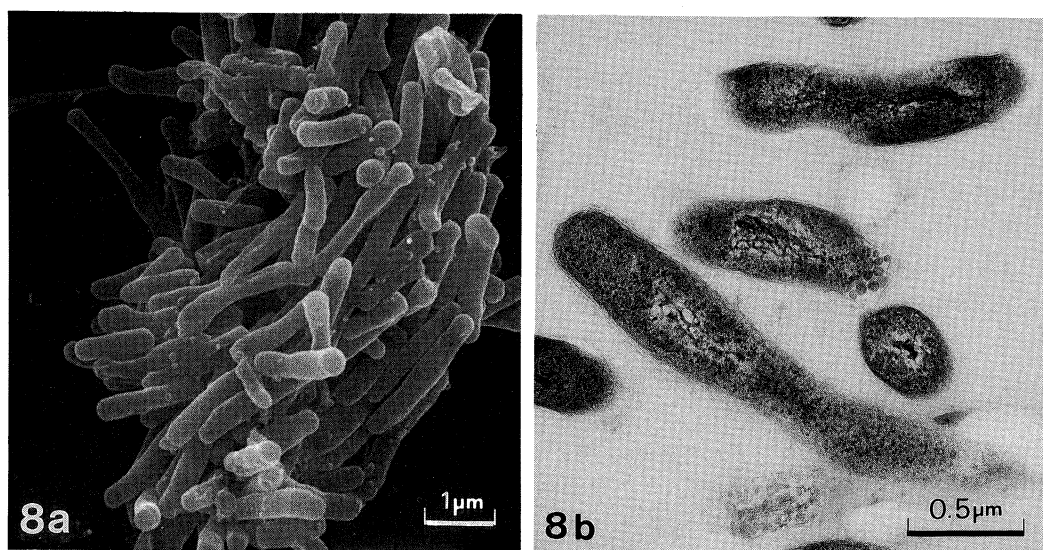


Fig. 8 a. SEM of cultured BCG ($\times 10000$).

b. TEM of cultured BCG, electron-dense small granules were seen in BCG ($\times 25000$).

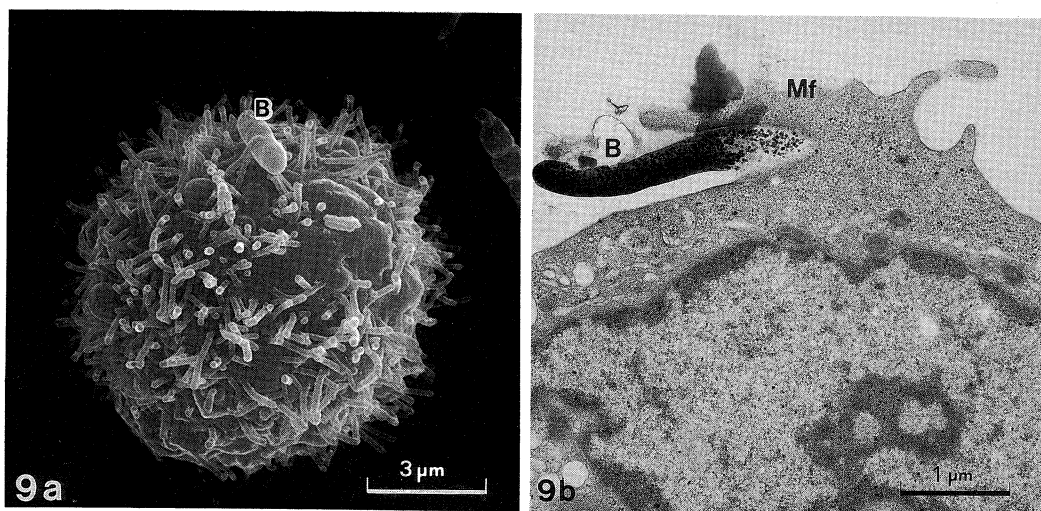


Fig. 9 a. SEM 1 hr after inoculation of BCG. The microfold of an isolated M cell has caught bacteria ($\times 7000$).

b. TEM of an M cell 1 hr after inoculation of BCG. The microfold of the isolated M cell extends into bacteria ($\times 15000$).
B; BCG, Mf; microfold

考 察

1974年 Owen らは、ヒト小腸パイエル板 FAE 細胞のなかで太く短い microfold が疎に細胞表面に配列し、また細胞内にリンパ球、マクロファージ、形質細胞などを内包した細胞を microfold cell (M cell) と名付けた。¹⁾ その後

M cell 表面は吸収上皮に比べ薄い糖衣で覆われ、さらに組織化学的には細胞膜は周囲の上皮に比べ高い esterase 活性と逆に低い alkaline phosphatase 活性を示すことが明らかとなった。¹⁸⁾ M cell の機能について Owen らは、マウス小腸パイエル板の M cell から異種蛋白抗

原である peroxylase や vibrio cholerae が pinocytosis, phagocytosis によって取り込まれ内包するリンパ球, マクロファージに伝達されていることを証明した.^{5), 8)} 以後 M cell からの選択的抗原取り込みと, 経消化管的抗原感作の成立についての報告が相次いでなされ当教室の内田は家兎虫垂リンパ濾胞ドーム上の M cell による Escherichia coli (o-124, k-72) の取り込みを,¹⁹⁾ また家兎小腸パイエル板における ligation loop 法を用いて藤村は BCG 菌,⁹⁾ 長崎は溶連菌および溶連菌製剤が M cell から選択的に取り込まれることを電顕的に証明している.¹⁰⁾

さらに近年の免疫組織化学の進歩により GALT における局所免疫防御機構の解明にあたって, 経消化管抗原感作リンパ球の homing mechanism^{20)~22)} や FAE 細胞群の lymphocyte subset 解析^{11), 23)~25)} は目ざましい進歩を遂げている. M cell の細胞表面は HLA-DR 陽性, IL-1 陽性であることが証明され GALT における antigen presenting cell としての役割, すなわち外来抗原を選択的に取り込み直接的な抗原呈示, もしくは内包するリンパ球, マクロファージや FAE 内に存在する上皮細胞間リンパ球, dendritic cell を介しての抗原呈示機構の first line としての役割が解明されつつある.¹¹⁾ しかし M cell がなぜ抗原物質を選択的に捕捉し取り込むかおよび抗原呈示細胞群相互の関連については, いまだ不明なままである.

M cell の機能評価は従来 ligation loop 法が用いられてきたが, 個体差や個々のリンパ濾胞ドーム間隔差が著しく, その評価には問題が残されていた. さらに monoclonal 抗体を用いた免疫組織化学の進歩に対応するためには M cell をより安定的に単離し in vitro で M cell に対する activator, suppressor substance さらには内包する細胞に対しての chemical mediator などの検討が必要と考えられ, その第一歩として著者は今回の実験を計画した.

摘出後のパイエル板において M cell は, is-chemia, pH などの条件変化によって容易に破

壊される. 摘出したパイエル板を細切し室温 HBSS 中に 2 hr 以上放置すると FAE 細胞群のなかでまず M cell が絨毛形態に変化をきたし隆起し破壊脱落していく像が観察される. また単離にあたって 37°C, O₂ incubator を用いた従来の酵素法^{13), 26)} や, percoll 密度勾配を用いた高速遠沈法では, M cell は内包するリンパ球, マクロファージを放出し容易に破壊されてしまう. このためパイエル板摘出後の一連の操作は 4°C pH 調整 HBSS 中で迅速に行う必要があった.

家兎のリンパ濾胞ドームは絨毛に包み込まれるように存在するため, 効率よく FAE 層を剝離するためには濾胞ドームのみを摘出することが必要であった. このため paraffin 板上にパイエル板を固定し濾胞ドームの大きさに最も近い 22G 注射針を摘出に利用した.

細胞障害の軽減を図るため trypsin, EDTA 濃度を最小限にとどめ, 反応時間も必要最小限にとどめる必要があった. さらに赤血球混入に対しては塩化アンモニウム処理は行わなかった. 浸透圧差による細胞の ballooning 化に対しては新たに bovine serum 添加を 3% から漸増し 10% まで試みたが, 10% 時が最も良好と考えられた. また bovine serum を添加することによる粘稠度の上昇は flowcytometry による sorting 操作に影響を及ぼさなかった.

flowcytometry は, レーザービームを単離した細胞に照射し, 透過光線 (FSC) と散乱光線 (SSC) を電気信号に変換することによって一つ一つの細胞特性を認識する方法である. すなわち濾胞ドームから剝離された FAE 細胞群とドーム摘出面から混入してくるリンパ球, 赤血球を含む細胞浮遊液から, 大きく, 内部構造の複雑な細胞を FSC, SSC とともに大きい細胞として選択的に取り出すことができる. M cell は濾胞ドーム基底部を除き吸収上皮に比べ大きく, リンパ球, マクロファージなどを内包しているため他の細胞に比べはるかに複雑で特徴的な内部構造を持っている. このため M cell 単離に flowcytometry は最も適した方法と考え

られた。

単離された M cell は形態学的に比較的よく維持されており、食食機能も維持されていたが、染色性の変化など詳しい検討は今後の検討課題として残された。M cell による抗原取り込み機構には分泌型 IgA や細胞膜の表面荷電などの関与が当然考えられる。さらに抗原呈示細胞群の活性化には至適温度が大きく関与している。しかし、より生理的条件に近い状態で M cell を高率に単離できれば、GALT における M cell の細菌など抗原の取り込み機構の解明に大きく寄与できるものと考えられた。

結 論

1) 今回の実験結果により従来の報告例に比べ形態的に維持された M cell を単離回収する方法を確立することができた。

2) 単離操作にあたっては温度、pH 管理が最も重要であった。

3) M cell の特徴的構造を利用した flow-cytometry 法は M cell 単離に有効と考えられた。

稿を終えるにあたり、木原 彊教授の直接の御指導と御校閲に深く感謝いたします。

本論文の要旨は昭和63年9月、第20回日本臨床電子顕微鏡学会総会において発表した。

文 献

- 1) Owen, R. L. and Jones, A. L.: Epithelial cell specialization within human Peyer's patches: An ultrastructural study of intestinal lymphoid follicles. *Gastroenterology* 66: 189—203, 1974
- 2) Owen, R. L. and Nemanic, P.: Antigen processing structure of the mammalian intestinal tract: An SEM study of lymphoepithelial organs. *Scan. Electron Microsc.* 2: 367, 1978
- 3) Kihara, T., Fujimura, Y., Uchida, J., Miyashima, N. and Nagasaki, S.: Structure and origin of microfold cells in solitary lymphoid follicle of human larynx. *J. clin. Electron Microsc.* 19: 5—6, 1986
- 4) Wolf, J. A.: The membranous epithelial (M) cell: A portal of antigen entry. *In* inflammatory bowel disease, eds. by Kirsner, J. B. and Shorter, R. G. Philadelphia, Lea & Febiger 3: 75—85, 1988
- 5) Owen, R. L.: Spuential uptake of horseradish peroxidase by lymphoid follicle epithelium of Peyer's patches in normal unobstructed mouse intestine: An ultrastructural study. *Gastroenterology* 72: 440—451, 1977
- 6) Wolf, J. L., Kaufmann, R. S., Finberg, R., Dambrauskas, R., Fields, B. N. and Trier, J. S.: Determinants of reovirus infection with the intestinal M cells and absorptive cells of murine intestine. *Gastroenterology* 85: 291—300, 1983
- 7) Wolf, J. L., Dambrauskas, R., Sharpe, A. H. and Trier, J. S.: Adherence to and penetration of the intestinal epithelium reovirus type I in neonatal mice. *Gastroenterology* 92: 82—91, 1987
- 8) Owen, R. L., Pierce, N. F., Apple, R. T. and Cray, W. D., Jr.: Phagocytosis and transport by M cell of intact vibrio cholerae into Rabbit Peyer's patch follicles. (abstr.) *J. Cell Biol.* 95: 446 a, 1982
- 9) Fujimura, Y.: Functional morphology of microfold cells (M cells) in Peyer's patches phagocytosis and transport of BCG by M cells into rabbit Peyer's patches. *Gastroenterol. Jpn.* 21: 325—335, 1986
- 10) Nagasaki, S., Kamoi, R., Kato, T., Kozuka, K., Miyashima, N., Fujimura, Y., Uchida, J. and Kihara, T.: M cell transport of *Streptococcus pyogenes*, Su strain, ATCC 2016 and OK-432

- from the intestinal lumen into rabbit Peyer's patches. *J. Electron Microsc.* 21 : 588—589, 1989
- 11) 名倉 宏, 鷺見幸子, 中村司郎: ヒトパイエル板および孤立リンパ小節の被覆上皮細胞間リンパ球の免疫組織学的観察. *消化器と免疫* 18 : 71—75, 1987
 - 12) Shimazui, T.: An ultrastructural study of the pathway and the location of migrating lymphocytes through the intestinal microfold cells (M cell). *J. clin. Electron Microsc.* 18 : 127—140, 1985
 - 13) 諏訪義光, 木村明美, 津島隆明, 竹森弘光, 千葉満郎, 黒江清郎, 吉田 豊: ヒト大腸上皮細胞分離・培養の検討. *消化器と免疫* 10 : 41—44, 1983
 - 14) Owen, R. L., Bhalla, D. K. and Apple, R. T.: Migration of Peyer's patch lymphocyte through intact M cells into the intestinal lumen in mice, rat and rabbit. *J. Cell Biol.* 95 : 332a, 1982
 - 15) Hasty, D. L. and Hay, E. D.: Freeze-fracture studies of the developing cell surface. II. Particle-free membrane blisters on glutaraldehyde-fixed corneal fibroblasts are artefact. *J. Cell Biol.* 78 : 756—768, 1978
 - 16) Karnovsky, M. J.: Use of ferrocyanide-reduced osmium tetroxide in electron-microscopy. (abstr.) *Proceedings, 11th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology.* Rockville, Md., American Society for Cell Biology. 1971, p. 146a
 - 17) Tsutsui, K., Kumon, H., Ichikawa, H. and Tawara, J.: Prepared method for suspended biological materials for SEM by using of polycationic substance layer. *J. Electron Microsc.* 25 : 163—168, 1976
 - 18) Owen, R. L. and Bhalla, D. K.: Cytochemical analysis of alkaline phosphatase and esterase activities and of lectin-binding and anionic sites rat and mouse Peyer's patch M cells. *Am. J. Anat.* 168 : 199—212, 1983
 - 19) Uchida, J.: An ultrastructural study on active uptake and transport of bacteria by microfold cells (M cells) to the lymphoid follicles in the rabbit appendix. *Gastroenterol. Jpn.* 20 : 379—394, 1987
 - 20) Gowans, J. K. and Knight, E. J.: The route of recirculation of lymphocytes in the rat. *Proc. R. Soc. Lond. [Biol]* 159 : 257, 1964
 - 21) Bazin, H., Levi, G. and Doria, G.: Predominant contribution of IgA antibody-forming cells to an immune response detected in extraintestinal lymphoids tissues of germ-free mice exposed to antigen by the oral route. *J. Immunol.* 105 : 1049, 1970
 - 22) 黒江清郎, 吉原綾子, 高橋 修, 二階 亮, 高橋賢郎, 秋山昌弘, 田村有志, 吉田 豊: 腸管リンパ球の帰巢に関する研究. *消化器と免疫* 20 : 17—21, 1987
 - 23) Selby, W. S., Janossy, G., Goldstein, L. and Jewell, D. P.: T lymphocyte subsets in human intestinal mucosa: The distribution and relationship to MHC-derived antigens. *Clin. exp. Immunol.* 44 : 453—458, 1981
 - 24) Wilders, M. M., Sminia, T., Plesch, B. E. C., Drexhage, H. A., Weltevreden, E. F. and Meuwissen, S. G. M.: Large mononuclear Ia-positive veiled cells in Peyer's patches. *Immunology* 48 : 461—467, 1983
 - 25) 名倉 宏, 堤 寛, 島村和男, 塩田吉宣, 長谷英章, 玉置憲一: ヒト腸管孤立リンパ小節の免疫組織学的研究. *消化器と免疫* 12 : 89—93, 1984
 - 26) Kemler, B. J. and Aipert, E.: Inflammatory bowel disease: Study of cell mediated cytotoxicity for isolated human colonic epithelial cell. *Gut* 21 : 353—359, 1980